

Correlation of genotype and phenotype in Beta-thalassemia

Citation for published version (APA):

Efremov, D. G. (1994). *Correlation of genotype and phenotype in Beta-thalassemia*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19940422de>

Document status and date:

Published: 01/01/1994

DOI:

[10.26481/dis.19940422de](https://doi.org/10.26481/dis.19940422de)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 2

SUMMARY

The main objectives of the studies presented in this thesis are: 1) the characterization of the molecular defects leading to β -thal in the countries of the former Yugoslavia and Bulgaria; 2) the correlation of these defects with different clinical phenotypes; and 3) a study of possible modifying factors, with special emphasis on those that can influence the Hb F levels in patients with β -thal.

CHAPTER 8

SUMMARY

A review of the literature is presented in Chapter 1, which includes a short historical perspective on the more important accomplishments in the study of the thalassemias. The ethnic distribution of the thalassemias is presented, with special emphasis on the frequency of β -thal in various Mediterranean countries. This chapter also provides a short description of the basic pathophysiological phenomena in β -thal, together with the more important clinical and hematological features of the disease. The review of the common molecular defects leading to β -thal is preceded by a description of the structure and function of the globin genes, their organization, and developmental expression. The possible role of different cis-acting elements in regulating the high level of expression of the β -globin gene in adult erythrocytes is discussed together with a brief description of the clinical features and molecular defects leading to the Langer MS. Regulation of the γ -globin gene expression by genetic factors, both linked and non-linked to the β -globin gene cluster, is presented in the section dealing with the different MDS syndromes. Special emphasis is given to the different γ -globin gene arrangements, and to the most frequent sequence variation associated with particular γ -globin thalassemias. The α -150 (C>T) mutation. An updated list of known β -thalassemic mutations is provided as an appendix to this chapter.

Relevant patient data and a description of some of the methodology used are presented in Chapter 2.

Chapter 3 provides detailed data about the background of various β -thal alleles in the populations of the former Yugoslavia and Bulgaria. The observed frequencies of the different mutations are compared to those of the neighboring countries, and the implications of this study in instituting a prenatal diagnosis program are discussed.

Characterization of the molecular defects in 50 β -thal heterozygotes and 22 unrelated β -thal homozygotes from the former Yugoslavia is presented in Chapter 3a. Fourteen mutations were observed; of these, seven [195-1-110 (G-A); 195-1-111 (T-A); 195-1-112 (G-A); 195-1-113 (G-A); 195-1-114 (G-A); 195-1-115 (G-A)] accounted for approximately 10% of all β -thal alleles. A newly characterized mutation [195-1-116 (G-A)] in the only β -thal allele observed so far in our country was found to be a four-nucleotide deletion with a frequency of 2.7%. Hb F levels were found to be a frequent and clinically significant abnormality since the association with β -thal often resulted in a severe disease. The high frequency of the 195-1-110 (G-A) and 195-1-111 (G-A) mutations led to the conclusion that most β -thal patients originating from the countries of the former Yugoslavia will be severely affected by these diseases.

CHAPTER 8

SUMMARY

The main objectives of the studies presented in this thesis are: 1) The characterization of the molecular defects leading to β -thal in the countries of the former Yugoslavia and Bulgaria; 2) the correlation of these defects with different clinical phenotypes, and 3) a study of possible ameliorating factors, with special emphasis on those that can influence the Hb F levels in patients with β -thal.

A review of the literature is presented in Chapter 1, which includes a short historical perspective of some of the more important accomplishments in the study of the thalassemias. The ethnic distribution of the thalassemias is presented, with special emphasis on the frequency of β -thal in various Mediterranean countries. This chapter also provides a short description of the basic pathophysiological phenomena in β -thal, together with the more important clinical and hematological features of the disease. The review of the common molecular defects leading to β -thal is preceded by a description of the structure and function of the globin genes, their organization, and developmental expression. The possible role of different cis-acting elements in regulating the high level of expression of the β -globin gene in adult erythroid cells is discussed together with a brief description of the clinical features and molecular defects leading to the Lepore Hbs. Regulation of the γ -globin gene expression by genetic factors, both linked and non-linked to the β -globin gene cluster, is presented in the section dealing with the different HPFH syndromes. Special emphasis is given to the different γ -globin gene arrangements, and to the most frequent sequence variation associated with particular β -thal chromosomes, the -158 (C→T) mutation. An updated list of known β -thalassemic mutations is provided as an appendix to this chapter.

Relevant patient data and a description of some of the methodology used are presented in Chapter 2.

Chapter 3 provides detailed data about the occurrence of various β -thal alleles in the populations of the former Yugoslavia and Bulgaria. The observed frequencies of the different mutations are compared to those of the neighboring countries, and the implications of this study in initiating a prenatal diagnosis program are discussed.

Characterization of the molecular defects in 50 β -thal homozygotes and 62 unrelated β -thal heterozygotes from the former Yugoslavia is presented in Chapter 3a. Fourteen different mutations were observed; of these, three [IVS-I-110 (G→A); IVS-I-6 (T→C); IVS-I-1 (G→A)] accounted for approximately 75% of all β -thal alleles. A newly discovered mutation (AATAAA→AATGAA in the poly A site) appeared to be rather common as it was observed in four unrelated families with a frequency of 4.7%. Hb Lepore was found to be a frequent and clinically significant abnormality since its association with β -thal often resulted in a severe disease. The high frequencies of the IVS-I-110 (G→A) and IVS-I-1 (G→A) mutations led to the conclusion that most β -thal patients originating from the countries of the former Yugoslavia will be severely affected by their diseases.

Chapter 3b presents data from the DNA analysis in 64 β -thal homozygotes from Bulgaria using ASO hybridization of PCR amplified DNA. Thirteen different β -thal alleles were identified; most frequent were the IVS-I-110 (G→A) (24.2%) and CD 39 (T→C) (21.9%) mutations. However, seven additional mutations were observed which were present at frequencies of 3.9 to 10.2%. The even distribution of nine different mutations is likely to complicate the analyses for institutions involved in prenatal diagnosis. High frequencies of 4.7 to 5.5% were observed for four rare mutations. These frameshift mutations (at CDs 5, 6, 8, and 8/9), as well as the poly A mutation identified in Macedonia, appear to be specific for these populations.

The correlation of particular clinical phenotypes with the different β -thal mutations is described in **Chapter 4**. **Chapter 4a** presents the study of 10 patients with the Hb Lepore/ β -thal condition, originating from the countries of the former Yugoslavia, who showed significant variations in the severity of the disease. As the type of Hb Lepore was the same in all patients (Lepore-Boston-Washington) and an α -globin gene deficiency was absent, it was concluded that the type of β -thal determined the severity of the disease. The latter was confirmed through characterization of the β -thal alleles; six patients with severe disease had either a β^0 or a severe β^+ mutation [CD 39 (C→T); IVS-I-1 (G→A); IVS-I-110 (G→A)], three patients with mild disease had the IVS-I-6 (T→C) mutation, while the β -thal determinant in one patient remained unknown. Further characterization of the β -thal allele in this patient is presented in **Chapter 4b**. Sequence analysis of PCR amplified DNA revealed a T→A mutation within the ATA box at position -30 nt from the Cap site. The same mutation was present on both chromosomes in a young Turkish patient with thalassemia intermedia. While the Hb F levels in the Turkish patient were low (13.1%), they were extremely high in the Hb Lepore/ β -thal compound heterozygote (80%). The mutation was found on two different haplotypes (IV in the patient with high Hb F, and VII in the patient with low Hb F), suggesting a role for the chromosomal background in determining the level of Hb F expression.

The molecular characterization of β -thal alleles in 47 homozygotes from Turkey, presented in **Chapter 4c**, provided sufficient data to correlate some less frequent mutations with particular phenotypes. Mild disease was observed in patients homozygous for the IVS-I-6 (T→C), CD 8 (-AA), -87 (C→G), and IVS-I-5 (G→T) mutations, or compound heterozygotes for combinations of these mutations. Moderate disease was present in patients with one of these mutations and a severe mutation such as the IVS-I-110 (G→A), IVS-I-1 (G→A), and CD 39 (C→T). Two β^0 mutations (IVS-II-1 and CD 8) were consistently associated with a mild phenotype and high total Hb and Hb F levels. These mutations were found on two different haplotypes (III and IV), both containing the C→T substitution at position -158 (G_y).

The effect of different chromosomal backgrounds was analyzed in detail in 29 homozygotes for the IVS-I-6 (T→C) mutation, none of whom had received a blood transfusion for at least six months prior to the study. The obtained data, described in **Chapter 5**, showed higher Hb levels in patients with high Hb F of a concomitant α -thal-2 heterozygosity. The IVS-I-6 (T→C) mutation was found in three different haplotypes; most of

the patients were homozygous for haplotype VI, but haplotypes IV and VII were also present. The only haplotype IV homozygote had high Hb F levels, while both high and low Hb F levels were observed among patients with haplotypes VI and VII. Sequence analysis of regulatory *cis*-acting elements was undertaken in two patients with high Hb F (one homozygote each for haplotypes VI and IV) and in two patients with low Hb F (one homozygote each for haplotype VI and VII). Haplotype specific differences were observed in the LCR 5' HS-2 and in the G_γ and A_γ 5' flanking and IVS-II regions, while all chromosomes were identical in the 5' LCR HS-4, HS-3, and the 5' flanking region of the β -globin gene. The -158 (C→T) substitution appeared most likely to be responsible for the elevated Hb F levels observed in association with haplotype IV. The absence of nt differences between the low and high Hb F-producing haplotype VI chromosomes suggested a major role for unknown genetic factors, separated from the β -globin gene cluster, in controlling the Hb F production in these β -thal patients.

The effect of the -158 (C→T) substitution was further evaluated through the study of the Atlanta type of HPFH. Chapter 6 provides details on the molecular analysis of this condition, previously characterized as a $G_\gamma G_\gamma$ arrangement with the -158 (C→T) substitution in the promoters of both G_γ genes. Sequence analysis identified the -158 (C→T) mutation and the CD 136 (C→G) substitution as the only differences between the 3' γ gene from this arrangement, and the A_γ gene from a chromosome with haplotype #3 (Senegal). The absence of any other nt substitutions provided genetic evidence that the -158 (C→T) mutation is primarily responsible for the elevated Hb F levels associated with this condition. A quantitative RT/PCR procedure was developed to determine the effect of this mutation on γ -globin gene transcription in four individuals with the Atlanta type of HPFH. High levels of γ transcripts were observed in all individuals (9-38%), and were highest in one female with a moderate anemia. The G_γ and the 3' γ genes of the Atlanta type of HPFH chromosome expressed similar amounts of transcripts, which were over 10 times higher than those of the A_γ gene from the normal chromosomes. These data demonstrated that the -158 (C→T) mutation directly affects the transcriptional rate of the gene to which it is associated.

The data presented in this dissertation provide a satisfactory explanation for the observed phenotypic variations in most of the studied β -thal patients. Apart from the presence of a mild β -thal allele, increased Hb F expression is the most important factor which can contribute to a mild clinical phenotype. Genetic factors, both linked and non-linked to the β -globin gene cluster, can affect the levels of Hb F in β -thal patients. Clinically, the most significant *cis*-acting factor is the -158 (C→T) mutation which exerts a positive regulatory effect on the associated γ -globin gene. The *trans*-acting factors influencing the levels of Hb F in β -thal require further characterization. The competitive RT/PCR assay may prove useful in investigating these factors and in monitoring the effects of pharmacological manipulation of γ -globin gene expression.

Samenvatting

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft de volgende doelstellingen: (1) Het karakteriseren van de moleculaire defecten welke aanleiding geven tot β -thalassemie in het voormalig Joegoslavië en in Bulgarije; (2) de correlatie van deze defecten met de verschillende klinische phenotypen; en (3) een onderzoek naar mogelijk factoren met een positief effect op de ziekte, met speciale aandacht voor factoren die de HbF-niveaus beïnvloeden bij patiënten met β -thalassemie.

Hoofdstuk 1 is een overzicht van de literatuur. Het begint met een kort historisch overzicht van de belangrijkste resultaten van de onderzoeken aan thalassemie. De etnische distributie van thalassemieën wordt beschreven, met speciale aandacht voor de frequentie van β -thalassemie in de verschillende landen rond de Middellandse Zee. Het hoofdstuk geeft ook een beschrijving van de basale pathofysiologische karakteristieken van β -thalassemie, samen met de belangrijke klinische en haematologische bevindingen bij deze ziekte. Het overzicht van de genetische defecten die aanleiding geven tot β -thalassemie wordt voorafgegaan door een beschrijving van de structuur, functie, organisatie en ontwikkelingsafhankelijke expressie van de globine genen. De mogelijke rol van de verschillende *cis*-werkende elementen bij het reguleren van de hoge expressie niveaus van de β -globine genen in volwassen erythroïde cellen wordt aan de orde gesteld, samen met een korte beschrijving van de klinische karakteristieken en moleculaire defecten die leiden tot de Lepore haemoglobinen. Regulatie van de γ -globine gen expressie door genetische factoren, die al of niet gekoppeld zijn aan het β -globine gen cluster, wordt bediscussieerd in het gedeelte dat gaat over de verschillende HPFH syndromen. Speciale aandacht wordt geschonken aan de verschillende γ -globine gen rangschikkingen, en aan de meest voorkomende sequentie variatie geassocieerd met bepaalde β -thalassemie chromosomen, de -158 (C→T) mutatie. Een bijgewerkte lijst van bekende β -thalassemie mutaties wordt als appendix toegevoegd aan dit hoofdstuk.

Relevante patiënt gegevens en een beschrijving van verschillende gebruikte technieken worden beschreven in **hoofdstuk 2**.

Hoofdstuk 3 geeft gedetailleerde informatie over het voorkomen van verschillende β -thalassemie allelen in de bevolkingsgroepen van het voormalig Joegoslavië en Bulgarije. De waargenomen frequenties van de verschillende mutaties worden vergeleken met die van de buurlanden. De implicaties van deze studie, met name voor de prenatale diagnostiek, worden bediscussieerd.

Hoofdstuk 3a beschrijft de karakterisering van de moleculaire defecten in 50 patiënten die homozygoot zijn voor β -thalassemie, en 62 ongerelateerde heterozygote β -thalassemie patiënten uit het voormalig Joegoslavië. Veertien verschillende mutaties werden gevonden; drie hiervan [IVS-I-110 (G→A); IVS-1-6 (T→C); IVS-I-1 (G→A)] namen ongeveer 75% van alle β -thalassemie allelen voor hun rekening. Een nieuw ontdekte mutatie (AATAAA→AATGAA in het poly-A gebied) leek een vrij algemeen voorkomende mutatie, daar deze werd aangetroffen in vier ongerelateerde families met een frequentie van 4,7%. Van Hb Lepore werd vastgesteld dat het een frequente en klinisch significante aandoening is, omdat de associatie met β -thalassemie vaak resulteerde in ernstige ziekte. De hoge frequenties van de IVS-I-110 (G→A) en de IVS-I-1 (G→A) mutaties gaven aanleiding tot de conclusie dat de meeste β -thalassemie patiënten uit het vroeger Joegoslavië ernstig aangedaan zullen zijn door hun ziekte.

In **hoofdstuk 3b** worden de gegevens gepresenteerd met betrekking tot de DNA analyse van 64 β -thalassemie homozygoten uit Bulgarije, waarbij gebruik werd gemaakt van ASO hybridisatie m.b.v. PCR geamplificeerd DNA. Dertien verschillende β -thalassemie allelen werden geïdentificeerd; het meest frequent de IVS-I-110 (G→A) (24,2%) en de CD 39 (T→C) (21,9%) mutaties. Er werden echter ook zeven additionele mutaties gevonden, welke aanwezig waren met een frequentie van 3,9 tot 10,2%. De gelijkelijke verdeling van negen verschillende mutaties compliceert de prenatale diagnostiek. Hoge frequenties, van 4,7 tot 5,5%, werden gevonden voor vier bijzondere mutaties. Deze frame-shift mutaties (op CDs 5, 6, 8 en 8/9), en de poly-A mutatie geïdentificeerd in Macedonië, leken specifiek voor deze populatie.

De correlatie van specifieke klinische phenotypen met de verschillende β -thalassemie mutaties wordt beschreven in **hoofdstuk 4**. **Hoofdstuk 4a** beschrijft een studie van 10 patiënten met de Hb Lepore/ β -thalassemie constitutie, die afkomstig waren uit landen van het voormalig Joegoslavië, welke een significante variatie in de ernst van hun ziekte lieten zien. Omdat het type van Hb-Lepore in alle patiënten hetzelfde was (Lepore-Boston-Washington) en een α -globine gen deficiëntie afwezig was, werd geconcludeerd dat het type β -thalassemie de ernst van de ziekte bepaalt. Dit werd mede bevestigd door karakterisering van de β -thalassemie allelen; zes patiënten met ernstige ziekte hadden of een β^0 of een ernstige β^+ mutatie [cd 39 (C→T); IVS-I-1 (G→A); IVS-I-110 (G→A)], drie patiënten met een milde ziekte hadden de IVS-I-6 (T→C) mutatie, terwijl de β -thalassemie determinant in één patiënt onopgehelderd bleef. Verdere karakterisering van het β -thalassemie allel in deze patiënt wordt gepresenteerd in **hoofdstuk 4b**. Sequentie analyse met PCR geamplificeerd DNA resulteerde in een T→A mutatie in de ATA-box op positie -30 nt van de Cap site. Dezelfde mutatie was aanwezig in beide chromosomen van een jonge Turkse patiënt met een intermediaire thalassemie. Terwijl het HbF niveau in de Turkse patiënt zeer laag was (13,1%), was dit niveau in de Hb Lepore/ β -thalassemie compound heterozygoot zeer hoog (81%). De mutatie werd gevonden bij twee verschillende haplotypen (IV in de patiënt met een hoge HbF en VII in de patiënt met een lage HbF), hetgeen suggestief is voor een rol van de chromosomale achtergrond in het bepalen van het HbF expressie niveau.

De moleculaire karakterisering van β -thalassemie allelen in 47 homozygoten uit Turkije, beschreven in **hoofdstuk 4c**, verschaftte voldoende materiaal om enkele minder frequent voorkomende mutaties te correleren met bepaalde phenotypen. Milde ziekte werd gevonden in patiënten die homozygoot waren voor de IVS-I-6 (T→C), CD 8 (-AA), -87 (C→G), en IVS-I-5 (G→T) mutaties, of compound heterozygoot waren met combinaties van deze mutaties. Middelmatig ernstige ziekte werd aangetroffen in patiënten met één van de voornoemde mutaties in combinatie met een ernstige mutatie, zoals de IVS-I-110 (G→A), IVS-I-1 (G→A) of CD 39 (C→T) mutatie. Twee β^0 mutaties (IVS-II-1 en CD 8) waren consistent geassocieerd met een mild fenotype en een hoog totaal Hb en HbF niveau. Deze mutaties werden gevonden bij twee verschillende haplotypen (III en IV), welke beide de C→T substitutie op positie -158 (Gy) lieten zien.

Het effect van de verschillende chromosomale achtergronden werd gedetailleerd geanalyseerd in 29 homozygoten voor de IVS-I-6 (T→C) mutatie, waarvan niemand een bloedtransfusie had ontvangen gedurende de laatste 6 maanden voorafgaand aan het onderzoek. De verkregen data, beschreven in **hoofdstuk 5**, lieten hogere Hb niveaus zien in patiënten met hoge HbF en een additionele α -thalassemie-2 heterozygotie. De IVS-I-6 (T→C) mutatie werd gevonden in drie verschillende haplotypen; de meeste van de

patiënten waren heterozygoot voor haplotype VI, maar de haplotypen IV en VII waren ook vertegenwoordigd. De enige patiënt met haplotype IV homozygotie vertoonde hoge HbF niveaus, terwijl zowel hoge als lage HbF niveaus werden gezien bij patiënten met de haplotypes VI en VII. Sequentie analyse van de regulatoire, *cis*-werkende elementen vond plaats bij twee patiënten met hoge HbF (één homozygoot voor haplotype VI, de ander voor haplotype IV) en in twee patiënten met een lage HbF (één homozygoot voor haplotype VI, de ander voor haplotype VII). Haplotype specifieke verschillen werden gevonden in de LCR 5' HS-2, in de G γ en A γ 5' flankerende en in de IVS-II regionen, terwijl alle chromosomen identiek waren m.b.t. de 5'LCR HS-4, HS-3 en de 5' flankerende regionen van het β -globine gen. De -158 (C→T) substitutie, in combinatie met haplotype IV, leek verantwoordelijk voor verhoogde HbF niveaus te zijn. De afwezigheid van nucleotide verschillen tussen de lage en hoge HbF producerende haplotype VI chromosomen, suggereerde een rol van onbekende genetische factoren, die gescheiden zijn van het β -globine gen cluster, en die de HbF productie in deze β -thalassemie patiënten controleren.

Het effect van de -158 (C→T) substitutie werd verder geëvalueerd door de bestudering van de Atlanta type HPFH. **Hoofdstuk 6** geeft de details van de moleculaire analyse van deze aandoening, die eerder werd gekarakteriseerd als een G γ G γ met de -158 (C→T) mutatie en de CD 136 (C→G) substitutie als enig verschil tussen het 3' γ gen van deze toestand, en het A γ gen van een chromosoom van haplotype #3 (Senegal). De afwezigheid van alle andere nucleotide substituties vormde een genetisch bewijs voor het feit dat de -158 (C→T) mutatie primair verantwoordelijk is voor de verhoogde HbF niveaus die gevonden worden bij deze aandoening. Een kwantitatieve RT/PCR procedure werd ontwikkeld om het effect van deze mutatie op γ -globine gen transcriptie te bepalen bij vier individuen met het Atlanta type HPFH. Hoge niveaus van γ -transcripten werden gevonden bij alle individuen (9-38%), het hoogste niveau bij een vrouw met een middelmatige anemie. De G γ en de 3' γ genen van het Atlanta type HPFH chromosoom brachten vergelijkbare hoeveelheden transcript tot expressie, welke 10 maal hoger waren dan die van het A γ gen van de normale chromosomen. Deze gegevens laten zien dat de -158 (C→T) mutatie een direct effect heeft op de transcriptie snelheid van het gen waarmee het geassocieerd is.

De gegevens die in dit proefschrift worden gepresenteerd geven een bevredigende uitleg voor de waargenomen phenotypische variatie in de meeste van de bestudeerde β -thalassemie patiënten. Naast de aanwezigheid van een mild β -thalassemie allel, is de aanwezigheid van verhoogde niveaus van het HbF de meest belangrijke factor die aan een mild klinisch fenotype bijdraagt. Genetische factoren, zowel gekoppeld als niet-gekoppeld aan het β -globine genen cluster, kunnen de niveaus van het HbF in β -thalassemie patiënten beïnvloeden. Klinisch is de *cis*-werkende factor, de -158 (C→T) mutatie, het belangrijkste, welke een positief regulerend effect heeft op het geassocieerde γ -globine gen. De trans-werkende factoren, die de niveaus van HbF in β -thalassemie beïnvloeden, verdienen nog verder onderzoek. De competitieve RT/PCR assay kan een bruikbaar instrument zijn bij het bestuderen van deze factoren en voor het onderzoeken van de effecten van farmacologische manipulatie van de γ -globine gen expressie.